

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Biochemie



Radka Bušovská

## **Interakce vybraných kosmetických aditiv s biotransformačními enzymy**

Interaction of selected cosmetic additives with biotransformation enzymes

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2019

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne .....

.....

Podpis

## **Abstrakt**

Endokrinní disruptory jsou v dnešní době velmi často rozebíráním problematikou, kvůli jejich negativnímu vlivu na lidský organismus. Nacházejí se všude kolem nás a setkáváme se s nimi dennodenně, i když si to mnoho lidí ani neuvědomuje. Kosmetické přípravky a parfémy jsou součástí každodenního života člověka a jen málokdo si uvědomuje, jaký může mít jejich pravidelný styk s naší pokožkou následky. Parfémy a vonné látky jsou součástí všech kosmetických produktů či různých běžně používaných průmyslových výrobků, bez kterého se lidé už ani neobejdou. Parfémy mohou mít negativní vliv na zdraví organismu a kvůli početnému množství chemických látek, z kterého se skládají a jejich interakcí mezi sebou a následnou interakcí s důležitých enzymy jako je aromatas, mohou patřit do skupiny hormonálně aktivních látek. Cílem této práce bylo orientační a časově velmi výhodnou analytickou metodou TLC (chromatografie na tenké vrstvě, z angl. Thin Layer Chromatography) zjistit, zda mohou různé parfémy a průmyslové vůně do aut narušovat endokrinní systém inhibicí klíčového enzymu, aromatasy. Na základě experimentů se ukázalo, že běžně používané vůně s aromatas opravdu interagují.

## **Klíčová slova:**

Endokrinní disruptory, aromatas, TLC, chromatografie, parfémy, průmyslové vůně

## **Abstract**

Endocrine disruptors are nowadays very often discussed, due to their negative impact on the human body. They can be found all around us and they've become a part of our everyday life, even if many people don't even realize it. Cosmetic products and perfumes are part of everyday life and just few of many people realize the consequences of having regular contact with our skin. Perfumes and fragrances are part of all cosmetic products or various commonly used industrial products, that people could not even live without. Perfumes can have a negative effect on the health of the organism and, due to the large number of chemicals they consist of and the interactions with each other and the subsequent interaction with important enzymes such as aromatase, they can belong to the group of hormone-active substances. The aim of this work was to find out by TLC (Thin Layer Chromatography) analytical method whether various perfumes and industrial car smells can disturb the endocrine system by inhibiting the key enzyme, aromatase. Experiments have shown that the commonly used fragrances really interact with aromatase.

## **Keywords:**

Endocrine disruptors, aromatase, TLC, chromatography, perfumes, industrial fragrances

## **Poděkování**

Touto cestou bych chtěla poděkovat svému školiteli, prof. RNDr. Petrovi Hodkovi, CSc., za trpělivost, čas a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování mé bakalářské práce věnoval.

Děkuji své rodině a kamarádům za poskytnuté zázemí a podporu v průběhu celého mého studia.

# Obsah

1 Úvod.....	9
2 Teoretická část .....	10
2.1 Kosmetika .....	10
2.1.1 Složení.....	10
2.1.2 Parfémy.....	12
2.1.2.1 Historie.....	12
2.1.2.2 Složení .....	13
2.1.2.3 Nežádoucí účinky .....	15
2.1.3 Testování .....	16
2.1.4 Regulace .....	18
2.2 Endokrinní systém .....	20
2.2.1 Endokrinní dysfunkce .....	21
2.2.2 Steroidogeneze.....	22
2.2.3 Cytochromy P450 .....	23
2.2.3.1 CYP19 (aromatasa).....	24
2.2.4 Steroidní hormony.....	25
2.2.4.1 Testosteron .....	25
2.2.4.2 Estradiol .....	26
2.3 Tenkovrstevná chromatografie .....	26
3 Cíle práce.....	28
4 Materiál a metody .....	29
4.1 Materiál.....	29
4.1.1 Použité chemikálie.....	29
4.1.2 Použité přístroje .....	30
4.2 Metody .....	31
4.2.1 Sledování metabolické aktivity aromatasy metodou TLC .....	31
5 Výsledky práce .....	33
5.1 Optimalizace reakční směsi.....	33
5.2 Inhibice aromatasy .....	38
5.3 Testování .....	39
6 Diskuze .....	43

7 Závěr.....	45
8 Literatura.....	46

## Seznam použitých zkratek

EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
CIR	Průzkum kosmetických přísad
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
EVCAM	Evropské středisko pro validaci alternativních metod
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
RIFM	Výzkumný ústav pro vonné materiály
TTC	Prahová hodnota toxikologických hrozeb
ICCVAM	Koordinační výbor pro validaci alternativních metod
SCCS	Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitele
IFRA	Mezinárodní asociace parfémů
CYP19	aromatáza
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenasa
CYP17	17 $\alpha$ -hydroxylasa/17,20-lyasa
17 $\beta$ -HSD	17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza
CYP	cytochromy P450
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TST	testosteron
ESD	estradiol
MeOH	methanol
NADPH	nikotínamidadenín dinukleotidfosfát



# 1 Úvod

Hormonální aktivní látky jsou chemikálie, které mění funkci endokrinního systému. Jsou to látky schopné narušit endokrinní systém u lidí a volně žijících živočichů a způsobují tak nepříznivé účinky na zdraví organismu. Mohou být spojeny s poruchami učení, nedostatkem pozornosti, problémy kognitivních a mozkových funkcí a také mohou způsobit reprodukční problémy nebo potencovat vznik rakoviny. Jejich problematika se v dnešní době stále více klade do popředí, protože se nacházejí všude kolem nás. Široká škála přírodních či člověkem vytvořených látek způsobuje narušení hormonálního systému. Patří zde například léky, pesticidy, plastové lahve a setkáme se s nimi i v různých potravinách, pracích prostředcích či kosmetice.

K jedněmi z hlavních mechanismů jejich účinku patří vazba na buněčné receptory nebo inhibice klíčových enzymů, podílejících se na tvorbě steroidních hormonů. Aromatáza je klíčový enzym, který přeměňuje samčí pohlavní hormony na samičí. Inhibice tohoto enzymu vede k sníženým koncentracím estrogenů a může tím způsobovat nepříznivé reprodukční účinky.

Velmi výhodnou analytickou metodou pro zkoumání aktivity aromatázy a orientační identifikaci hormonální aktivních látek je chromatografie na tenké vrstvě. Je to efektivní, reprodukovatelná metoda, jejíž hlavní výhodou je časová nenáročnost. Na základě této metody je možné rychle a přesně odhalit narušení normální funkce aromatázy.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Kosmetika

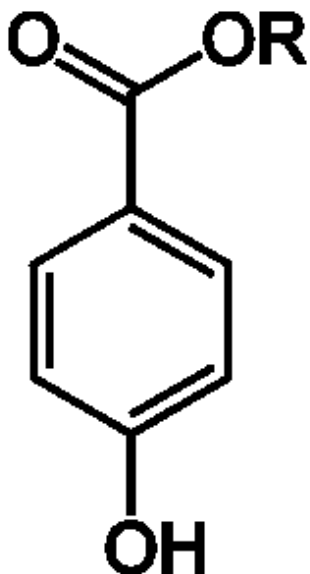
Kosmetiku běžně používají lidé na celém světě již od starověku s cílem vyčistit, zlepšit či změnit vzhled pokožky, vlasů, nehtů nebo zubů. Použití kosmetiky však v některých případech souvisí s výskytem nepříznivých účinků vyplývajících z přítomnosti chemických látek v těchto přípravcích. Odhaduje se, že ve velkém počtu v současnosti dostupných kosmetických výrobků je přítomno 10 000 chemických látek, včetně parabenů, ftalátů, p-fenylendiaminu, formaldehydu, dioxanu, triclosanu a mnohých kovů [1]. Tyto látky mohou být spojeny s mnoha onemocněními, jako jsou rakovina, vrozené vady či vývojové a reprodukční problémy [2].

#### 2.1.1 Složení

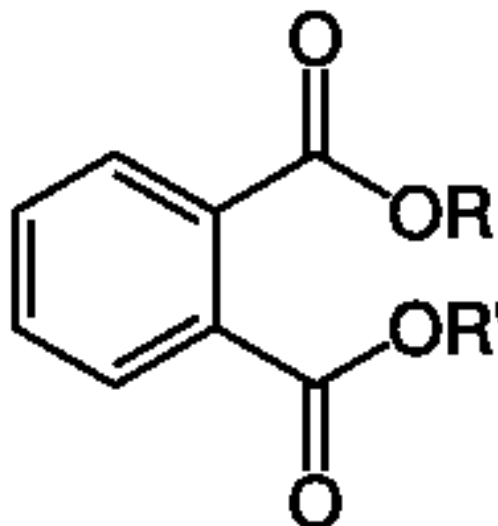
Běžně dostupné kosmetické produkty jsou založeny především na účinných látkách, které jsou následně z technických důvodů doprovázeny přídatnými složkami. Z účinných látek jde zejména o mastné kyseliny v případě krémů či detergenty v případě šampónů.

Kromě účinných látek obsahuje kosmetika stabilizátory, které chrání produkty proti oxidaci a následné degradaci, mikrobiálnímu růstu a proti UV záření. Patří sem především hydrofilní konzervanty prodlužující trvanlivost. Tuto funkci plní parabeny (Obr. 1 [3], str. 11), deriváty kyseliny para-hydroxybenzoové, které mají antibakteriální a antimykotické účinky nebo například sůl EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) [4].

Dalšími používanými aditivami jsou zahušťovadla, která zvyšují viskozitu produktu, a mohou být minerálního (křemičitan hořečnatý, oxid křemičitý) nebo lipidového charakteru (cetylalkohol), či syntetické, například polymery kyseliny akrylové [5]. Pro zklidnění pokožky a omezení ztráty vody se používají změkčovadla, mezi která patří včelí vosk, olivový olej, glycerin či ftaláty (Obr. 2 [6], str. 11).



Obr. 1: Obecný strukturní vzorec parabenů [3].



Obr. 2: Obecná chemická struktura ftalátů.  $R$  a  $R' = C_nH_{2n+1}$ ;  $n = 4-15$  [6].

Druhou skupinu látek vyskytujících se v kosmetických produktech jsou látky pomocné. Ty představují plnidla a rozpouštědla pro úpravu hustoty, mají ochranný vliv či omezují vypařování těkavých látek z parfémů. Důležitou roli v kosmetických výrobcích hraje též použité rozpouštědlo. V parfémech a kosmetických produktech, kde je třeba využití nepolárních rozpouštědel, se používají těkavé látky (estery, aldehydy) či alifatické alkoholy, v jiných kosmetických produktech je použita voda jako rozpouštědlo.

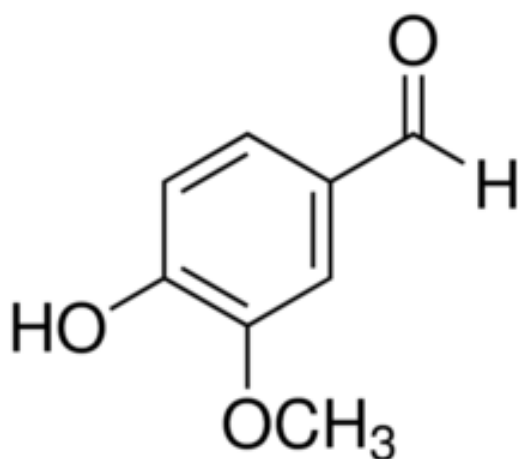
Mezi další pomocné látky patří ketolátky a izoprenoidy, které reagují s čichovými receptory. Důležitou složkou krémů a peelingů jsou emulgátory, které mění povrchové napětí mezi olejem a vodou za účelem zajištění homogenních směsí. Příklady používaných emulgátorů jsou polysorbáty, laureth-4 a cetylsulfát draselný [7].

Velmi důležitou společnou složkou všech kosmetických výrobků jsou parfémy, které činí obdobně jako barviva výrobek pro zákazníka atraktivním. Vyskytují se ve všech produktech kosmetiky, včetně těch, které jsou označeny jako neparfémované. Zde se však vyskytují v nízkých koncentracích pouze za účelem eliminace negativních pachů. Kromě toho, že jsou základní složkou většiny kosmetických produktů, tvoří parfémy též samostatnou kategorii kosmetiky.

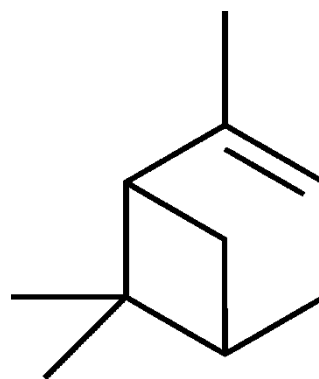
## 2.1.2 Parfémy

### 2.1.2.1 Historie

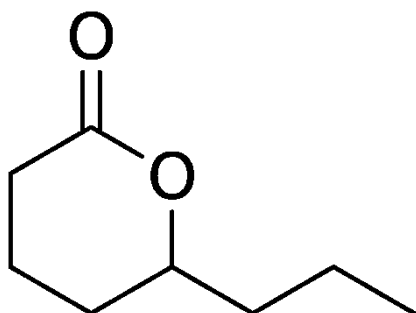
Název parfém pochází z latinského slova "per fumum", což v překladu znamená "skrze kouř" nebo "kouřem". Za první používané vůně se považují látky získávané ze dřeva při hoření [8]. Takto byly připraveny vonné látky především z volně se vyskytujících dřevin, například z borovice lesní (*Pinus sylvestris*). Jednalo se zejména o produkty degradace mastných kyselin, některé látky terpenické povahy a vonné sloučeniny vznikající degradací ligninu. Mezi tyto látky patří například (E, E)-Non-2,4-dien, vanilin (Obr. 3 [9]), alfa-pinen (Obr. 4 [10]), delta-oktalakton (Obr. 5 [11]), kyselina fenylactová a kyselina fenylpropanová (Obr. 6 [12]) [13].



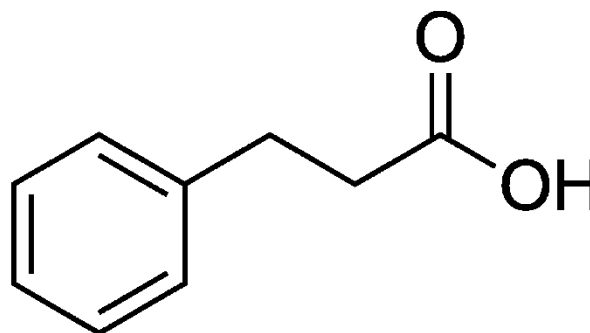
Obr. 1: vanilin [9]



Obr. 2: alfa-pinen [10]



Obr. 5: delta-oktalakton [11]



Obr. 6: kyselina fenylpropanová [12]

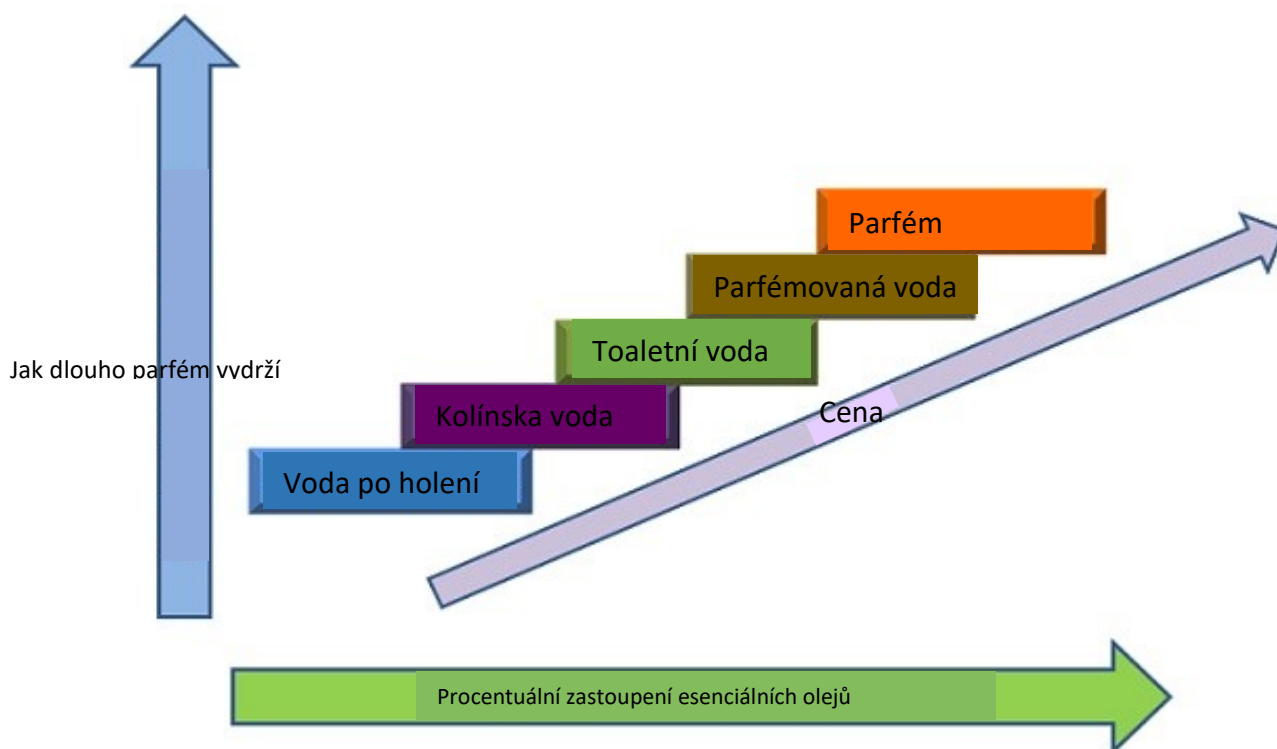
Prvním používaným parfémem bylo kadidlo asi před 4000 lety [14]. V antických dobách byly parfémy často spojovány s náboženskými rituály, později byly objeveny i terapeutické účinky vonného kouře. Po důkladném zkoumání se podařilo spojit těkavé aromatické látky z vonných rostlin s olejem a tukem, čímž byly vytvořeny první aromatické masti. K této výrobě se zpracovávaly listy, květy, kořeny, větve, kůra či šťáva rostlin nejprve mechanicky, a následně převařováním se živočišným tukem nebo rostlinným olejem za účelem prodloužení trvanlivosti.

Později byla rozvinutá technika destilace a výroba esenciálního oleje. První moderní evropský parfém vznikl v roce 1370 na bázi alkoholu a sloužil jako předchůdce dnešní kolínské vody. Ve středověku se aromatické parfémy začaly používat jako lék proti chorobám a jako dezinfekční prostředek při nebezpečí nákazy. V polovině 18. století se místo těžkých opojných vůní začaly upřednostňovat osvěžující a lehké květinové vůně [8].

Od 20. století se začaly vyrábět umělé vůně, takže drahé suroviny bylo možné nahradit synteticky připravenými vonnými látkami. Pro odvětví parfémů to znamenalo začátek experimentování s novými cenově dostupnými látkami. Od šedesátých let minulého století rozhoduje o úspěchu parfémů zejména reklama a marketing, kvůli jejich velkému množství na trhu [8].

#### 2.1.2.2 Složení

Na základě procentuálního zastoupení alkoholu se parfémy dělí na kolínskou vodu, toaletní vodu, parfémovou vodu a parfém, který je nejkoncentrovanější formou aromatických látek (Obr. 7 [15], str. 13). K tomu se přidává okolo 30 % tekutých vonných látek [8].



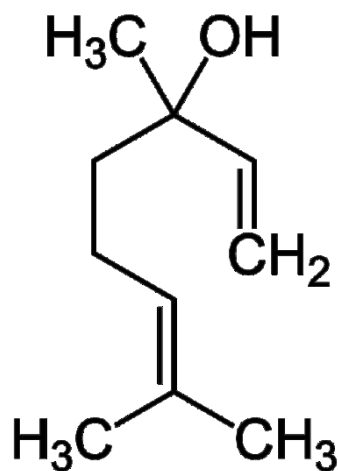
Obr. 7: Tento obrázek ukazuje typický vztah mezi cenou parfému, jeho životností a koncentrací silic [15].

V dnešní době má průmysl parfumerie k dispozici přibližně 3000 syntetických a 400 přírodních vonných látek, přičemž hotový parfém obsahuje směs 50 až 100 z nich [8]. Jsou to vonné látky, získané umělou či přírodní cestou, připomínající vůni květin, ovoce, koření, listů, plodů či kůry. Různá těkavost dala vzniknout třem základním kategoriím látek podle rychlosti výparu: hlava, tělo a základ parfému.

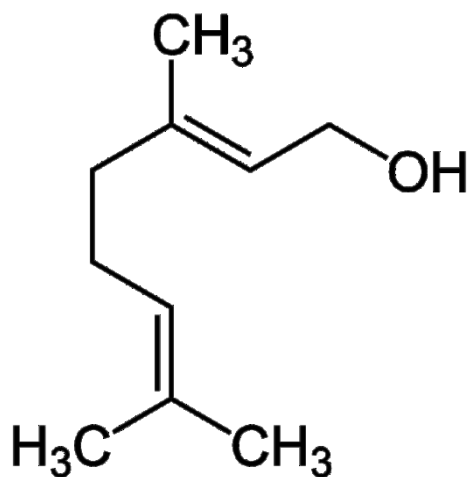
Některé parfémové složky jsou živočišné produkty, jako například ambra pocházející ze střev vorvaně, castoreum (Bobrovina, sekret ze žláz bobra), sekret z análních žláz cibet nebo nejsilnější a nejdražší - pižmo, které pochází z podkožního vaku samce Kabar ketonu, považováno také za afrodisiakum, protože obsahuje látky příbuzné feromonům. Na konci 20. století se do parfémů začaly přidávat další vonné složky, jako jsou čokoláda, karamel, mandle, med či sladké mléko [8].

Kromě těchto vonných látek se do parfémů přidávají fixativy, což jsou látky sloužící k prodloužení doby, po kterou je vůně parfému sensoricky vnímatelná. Taková délka fixace závisí především na struktuře vonných látek, zejména na funkční skupině a na molekulovém uspořádání. Často používanými terciálními alkoholy v parfumerství jsou linalool (Obr. 8

[16], str. 15), tetrahydrolinalool a dihydromyrcenol. Zatímco těmto terciálním alkoholům trvá odpaření 4 až 6 hodin, při použití primárních alkoholů, jako jsou například geraniol (Obr. 9, [17]) a citronellol, dojde k odpaření za 2 až 3 dny. Některá fixační činidla mají zároveň i příjemnou vůni (pižmo, geraniol). Pro vysokou účinnost je třeba, aby parfém obsahoval dostatečné množství fixačních činidel, ideálně v podobě kombinace vybraných fixativů [18].



Obr. 8: linalool [16]



Obr. 9: geraniol [17]

#### 2.1.2.3 Nežádoucí účinky

V současné době jsou známy případy, kdy některé vonné látky mohou způsobit astmatické reakce, zejména u pacientů s těžkým nebo atopickým astmatem [19]. Stejně i furanokumarín přítomný v přírodních extraktech grapefruitu nebo celeru může způsobit kožní alergické reakce a zvýšit citlivost na UV záření [20]. Nežádoucí účinky na kůži zahrnují alergickou kontaktní dermatitidu, okamžité kontaktní reakce a fotosenzitivitu. Vůně jsou z kosmetiky nejčastější příčinou alergické kontaktní dermatitidy, přibližně 1 % populace trpí alergií na některou z aromatických látek [21]. Jako vzorové látky pro zjištění kožní alergie se používá směs vůní, balzám z Peru, kalafuna a propolis [22].

Existují důkazy o tom, že syntetické náhražky pižma na bázi nitroaromátů (mošus - xylen) mohou podporovat riziko vzniku rakoviny u testovaných zvířat [23]. Zároveň však bylo zjištěno, že pro účely parfumerství je jejich používání bezpečné [24]. Mnohé přírodní aromatické látky (bazalkový či růžový olej) obsahují alergeny nebo karcinogenní sloučeniny,

jejichž bezpečnost je regulována nařízeními (např. povolené hladiny methyl eugenolu v nařízení EU o kosmetických přípravcích [25]) nebo prostřednictvím omezení stanovených Mezinárodní asociací pro parfémy.

Dalším nebezpečím je nesnášenlivost parfému inhalací, což se může projevovat bolestmi hlavy, kašlem, pocity nevolnosti a respiračními onemocněními [26]. Řada látek přítomných v parfémeh může být toxická pro drobné živočichy, například tricyklodecenyly allylether je častou součástí parfémů a zároveň pomáhá odpuzovat hmyz [27].

### 2.1.3 Testování

Výrobci používají pro testování výrobků údaje o bezpečnosti, které jsou již k dispozici o jednotlivých složkách a o výrobcích s podobným složením. Bezpečnostní údaje od dodavatelů kosmetických přísad jsou často publikovány ve vědeckých databázích (například PubMed a TOXNET). Průmyslově financovaná skupina vědeckých a lékařských expertů posuzuje bezpečnost kosmetických složek a poskytuje informace o bezpečnosti používaných látek v rámci Průzkumu kosmetických přísad (*Cosmetic Ingredient Review*, CIR) [28].

Pro stanovení bezpečnosti nových výrobků využívají Spojené státy americké i testování na zvířatech. Ve všech případech, kdy se používá testování na zvířatech, si americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (*U.S. Food and Drug Administration*, FDA) prosazuje, aby výzkum a testování poskytovaly maximální množství užitečných informací od minimálního počtu využitých zvířat a snaží se využívat nejhumánnější možné metody testování [29].

Komerční testování kosmetiky na zvířatech je v Evropské unii od roku 2009 zakázáno. Zákaz testování hotových kosmetických výrobků na zvířatech je platný od 11. září 2004. Zákaz testování kosmetických přísad nebo kombinace přísad na zvířatech a zákaz uvádění na trh hotových kosmetických výrobků a přísad EU, které byly testovány na zvířatech, je platný od 11. března 2009 [30].



Pro vyvíjení a hodnocení nových alternativ testování na zvířatech má Evropská unie k dispozici Evropské středisko pro validaci alternativních metod (The European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM). Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) je nadnárodní organizace se sídlem v Paříži pro koordinaci ekonomické a sociálně-politické spolupráce členských států EU [31]. Seznam validovaných alternativních metod je možné nalézt na stránkách ECVAM a AltTox [32].

Alternativními metodami se testuje akutní toxicita, která zahrnuje posouzení obecných toxických účinků jednorázové dávky nebo vícenásobných dávek chemické látky nebo produktu na myši embryonální fibroblastové buněčné linie [33]. Těmito alternativními metodami *in vitro* nelze zkoumat chronickou toxicitu, která se dá zkoumat pouze *in vivo* testy na hlodavcích. Zde se zpravidla zkoumá orální [34] a dermální toxicita [35].

Právě absence testování chronické toxicity je problémem kosmetických výrobků, jelikož řada negativních účinků se může projevit až následkem dlouhodobého užívání daného výrobku.

Použitím buněčných linií a embryonálních buněk *in vitro* se zkoumá potenciál chemikálií způsobit karcinogenezi [36]. Použitím embryonálních buněk fibroblastů je zkoumána fototoxicita [37]. Některé studie však ukázaly, že pozitivní fototoxický výsledek na embryonálních buňkách nemusí nutně korelovat s výsledky dobrovolníků u lidí.

Komerčně dostupné modely rekonstruované lidské pokožky EpiSkin™, EpiDerm™ a SkinEthic™ vykazují podobnost s přirozenou lidskou pokožkou z hlediska morfologie a složení lipidů [38]. Tyto modely jsou platnou náhradou za *in vivo* testy a jsou často využívány k určení potenciálu degradace kožní tkáně či nenávratné poškození pokožky [39].

Výzkumný ústav pro vonné materiály (*The Research Institute for Fragrance materials*, RIFM) udržuje databázi fyzikálně-chemických, toxikologických a ekotoxikologických údajů o bezpečnosti vonných látek. Pro posuzování složek vůní zkoumá rify výpočetní toxikologii, metodiky *in vitro*, nové metody pro určení celkové expozice, vliv vonných látek na životní prostředí a posuzuje Prahovou hodnotu toxikologických hrozeb (*Threshold of Toxicological Concern*, TTC).

Lidské kmenové buňky z tukové tkáně byly zkoumány v testu inhibice adipogeneze jako adekvátního citlivého modelu *in vitro*. Tento test je vhodnou alternativou pro snížení počtu zvířat pro testování v prvních krocích předpovídání vysoce toxických látek [40].

Výše uvedené alternativní metody spolu s testováním na zvířatech byly využívány i pro zkoumání vonných látek v parfémtech. Klinické studie, které využívají zdravých dobrovolníků, testují běžně používané složky parfému jako linalol nebo limonen mikronukleárním testem na periferních lidských lymfocytech *in vitro*, na zvířatech a v myších buňkách, kde se testuje aktivita enzymů [41].

Tyto alternativní testy následně vyhodnotí Koordinační výbor pro validaci alternativních metod (ICCVAM, z angl. *The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) s cílem zajistit, aby alternativní test mohl přesně určit, zda je výrobek nebezpečný.

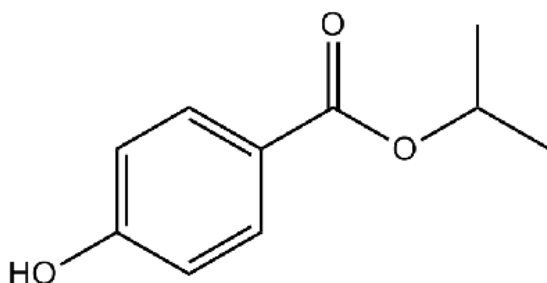
#### 2.1.4 Regulace

Cílem Spojených států amerických a Evropské unie je zajistit bezpečnost kosmetických výrobků pro spotřebitele prostřednictvím vědecky podložené regulace. V USA je kosmetický průmysl regulován FDA, který má širokou regulační pravomoc v rámci zákona o potravinách, lécích a kosmetických přípravcích. V rámci Evropské komise je Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 důležitou evropskou legislativou upravující hotové kosmetické výrobky EU [42]. Každá země v EU má příslušný orgán odpovědný za dodržování tohoto souladu.

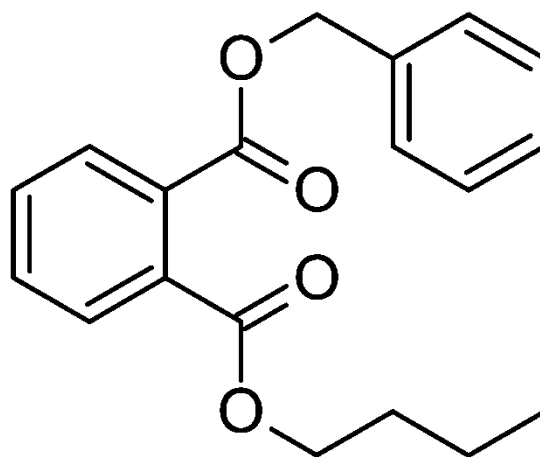
Důkaz o bezpečnosti kosmetického přípravku a každé jeho složky je odpovědností výrobce nebo jeho distributora jak v USA tak v EU, přičemž v EU musí být navíc vypracována zpráva o bezpečnosti kosmetického přípravku v souladu s požadavky, které určuje legislativa a platné normy [42]. Pro kosmetické výrobky není potřeba žádné povolení před uvedením na trh s výjimkou barevných přísad a v EU navíc s výjimkou účinných látek na ochranu před slunečním zářením a konzervačních látek.

Nezávislé vědecké výbory poskytují kvalifikovaná vědecká doporučení o kosmetických přípravcích. V EU je to Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitele (*Scientific Committee on Consumer Safety, SCCS*), který je zodpovědný za prozkoumání všech složek kosmetiky, které jim EU pošle k posouzení. Bezpečnostní posudky SCCS jsou veřejně dostupné na internetových stránkách [43]. Nezávislým vědeckým výborem, který posuzuje kosmetické přípravky v USA je CIR, jehož bezpečnostní stanoviska jsou publikována ve vědecké literatuře a jsou veřejně dostupná [44].

Předpisy FDA uvádějí složky, které se v kosmetických přípravcích nesmějí používat [45]. Mezinárodní asociace parfémů (*International Fragrance Association, IFRA*) stanovilo 174 vonných látek, které byly zakázány nebo omezeny ve výrobcích. EU zakázala 1 378 látek, z toho 80 % však nikdy nebylo použitých v kosmetických prostředcích [46]. Isopropylparaben (Obr. 10 [47]) je, jako i všechny parabeny, kromě methylparabenu a ethylparabenu, zakázán, protože inhibují aromatázu [48]. Zakázán je i butyl benzyl ftalát, který je jednou z nejčastěji používaných látek v chemickém průmyslu a je považován za karcinogen, který narušuje lidský hormonální systém a reprodukci (Obr. 11 [49]).



Obr. 10: Isopropylparaben [47]



Obr. 11: butyl benzyl ftalát [49]

V USA i v EU musí být všechny složky kosmetického přípravku na něm uvedené. Pokud jde o vůni nebo chuť, mohou být složky na etiketě uvedeno jako "vůně" nebo "aroma" s výjimkou 26 specifických složek parfémů v EU, které musí být zahrnuty do seznamu složek. Opalovací krémy jsou v USA regulovány jako volně prodejné léky a v EU

jsou považovány za kosmetiku, přičemž UV filtry vyžadují před uvedením na trh schválení [42].

## 2.2 Endokrinní systém

Endokrinní systém (také označovaný jako hormonální systém) patří spolu s imunitním a nervovým systémem ke třem velmi důležitým kontrolním systémům u savců. Pro zajištění homeostáze je třeba dokonalé řízení organismu, což zajišťuje soustava žláz s vnitřní sekrecí spolu s nervovou soustavou, které reagují na podněty jak vnějšího, tak vnitřního prostředí.

Endokrinní systém zahrnuje všechny žlázy v těle, jejichž produkty jsou hormony. Pro ně je charakteristické, že mají specifický účinek, působí cíleně na konkrétní tkáň a mají velmi vysokou účinnost, takže stačí malá koncentrace látky pro vyvolání potřebné reakce. Endokrinní žlázy vylučují do organismu tři druhy hormonů: deriváty aminokyselin, polypeptidy a steroidní hormony. V těle člověka je známo více než 50 funkčních hormonů [50].

Endokrinní systém se vedle savců vyskytuje i u dalších obratlovců (ryby, obojživelníci, plazi a ptáci) a též u bezobratlých živočichů (šneci, humři, hmyz). Základní funkce endokrinního systému je regulace základních fyziologických funkcí, mezi které patří regulace hladiny cukru v krvi, regulace metabolismu, vývoj centrální nervové soustavy, růst či funkce a rozvoj reprodukčních systémů pomocí testosteronu a estrogenů [51]. V tkáních a žlázách se nacházejí specializované typy buněk, jejichž úkolem je syntetizovat, skladovat a uvolňovat hormony přímo do krve. Ty mohou působit přímo v místě vzniku a ovlivňovat tak mateřskou tkáň (autokrinní sekrece) a okolní tkáň (parokrinní sekrece) nebo jsou dopraveny systémově pomocí mízy, či krevním řečištěm na jiné místo, kde působí svým účinkem (endokrinní sekrece). Normální fungování endokrinního systému přispívá k udržení homeostáze a schopnosti těla kontrolovat a regulovat reprodukci, vývoj a chování jedince.

Steroidní hormony jsou lipofilní povahy, takže pronikají do buňky samovolně přes buněčnou membránu a díky vysoce specifické vazbě s receptorem působí přímo na DNA, což vede k odpovědi buňky transkripční proteiny [51]. Tento systém může být často narušován endokrinními „disruptory“.

### 2.2.1 Endokrinní dysfunkce

Existuje mnoho důkazů o tom, že různé chemikálie, které se nacházejí ve volné přírodě, mají potenciál narušit endokrinní systém u lidí a volně žijících živočichů. Endokrinní „disruptor“ je exogenní látka nebo směs, která mění funkci endokrinního systému, čímž způsobuje nepříznivé účinky na zdraví organismu nebo dokonce i jeho potomstva. Tyto látky mohou způsobit reprodukční problémy, zvýšit riziko vzniku rakoviny závislé od hormonů a mohou mít různé nepříznivé vlivy na růst a vývoj [52].

Za důležité cíle pro chemikálie narušující endokrinní systém se stále častěji považují klíčové enzymy, které se podílejí na syntéze a metabolismu steroidních hormonů. Enzymy cytochromu P450, odpovědné za vysoce specifické reakce v biosyntéze steroidů, jsou častými cílovými molekulami, vzhledem k jejich klíčové roli při tvorbě různých vysoce účinných endogenních steroidních hormonů. Některé chemikálie mohou způsobovat hormonální narušení a následnou toxicitu právě interferencí s funkcí klíčových enzymů zapojených do syntézy a rozpadu steroidů. Mnohé chemikálie jsou také agonisty nebo antagonisty estrogenového receptoru, i když mají většinou nízkou afinitu vzhledem k endogenním hormonům jako je 17- $\beta$ -estradiol a estron [53].

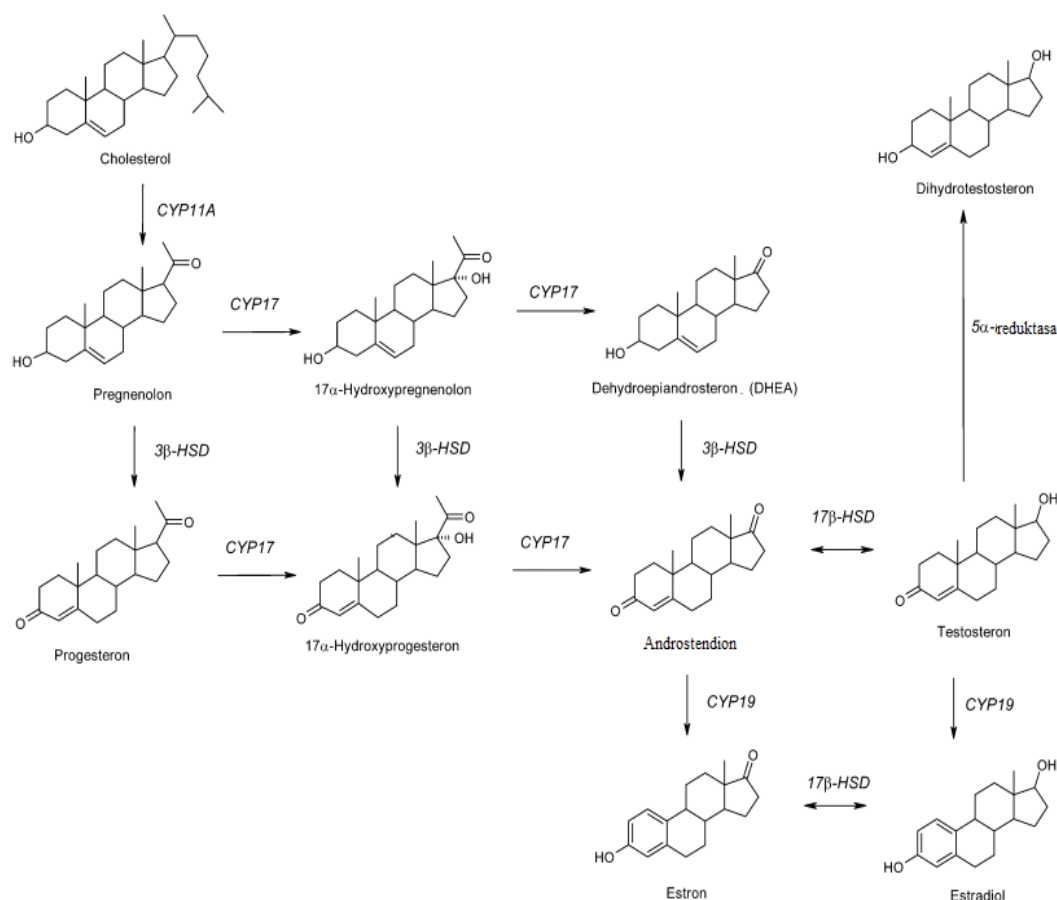
Katalyzátorem pro tvorbu estrogenů je aromatasa (CYP19), a to nejen v buňkách zapojených do syntézy estrogenů de novo (buňky ovariálních granulózních, lidské kůry nadledvin), ale také v tkáních, které využívají cirkulaci androstendionu či testosteronu jako prekurzorů (mozek, tuk a placenta). Aromatasa hraje velmi důležitou roli v sexuálním odlišení, vývoji, reprodukci a chování. Očekává se, že interference s katalytickou aktivitou aromatasy bude narušovat endokrinní regulační procesy, jako je estrální cyklus, rozvoj puberty, odlišení pohlaví a chování. Inhibice enzymů tvořících steroidní hormony může

nastat v případě substrátové kompetice nebo různými formami nekompetitivní inhibice [53].

### 2.2.2 Steroidogeneze

Steroidogeneze je soubor procesů, kterými se z cholesterolu vytvářejí biologicky aktivní steroidní hormony (Obr. 12 [53], str. 23). Jsou syntetizovány ve specifických buňkách především v nadledvinách, vaječnících, varlatech, placentě a mozku a mají důležitý význam v zachování reprodukčních schopností jedince, stejně tak jako v udržení homeostáze organismu. Syntéza všech steroidních hormonů de novo začíná přeměnou cholesterolu na pregnenolon (odštěpení postranního řetězce cholesterolu) prostřednictvím enzymu CYP11A. CYP11A se váže na vnitřní mitochondriální membránu a nachází se ve všech tkáních syntetizujících steroidní hormony. Pregnenolon se konvertuje na progesteron pomocí  $3\beta$ -hydroxysteroidů dehydrogenázy ( $3\beta$ -HSD), který nepatří mezi CYP. Pregnenolon a progesteron tvoří prekurzory pro všechny ostatní steroidní hormony. Všechny steroidogenní procesy probíhají v kůře nadledvin [52]. Enzym  $17\alpha$ -hydroxylasa/ $17,20$ -lyasa (CYP17) se nachází ve vaječnících a varlatech a je zodpovědný za  $17\alpha$ -hydroxylaci a rozklad C17-20 steroidních struktur, která se uskutečňuje v endoplazmatickém retikulu. V kůře nadledvin je CYP17 zodpovědný za hydroxylaci pregnenolonu a progesteronu za vzniku  $17\alpha$ -hydroxysteroidů. Dva  $17\alpha$ -hydroxylované steroidy mohou být pomocí CYP17 přeměněny na slabé androgeny, dehydroepiandrosteron a androstendion.

$17\alpha$ -hydroxysteroidy se dále konvertují na androstendion a testosteron ve vaječnících a varlatech. Rovnováha mezi těmito androgeny závisí na aktivitě  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza ( $17\beta$ -HSD). Aromatasa dále přeměňuje androstendion na estron a testosteron na estradiol [53].



Obrázok 12: Biosyntéza androgenů a estrogenů z cholesterolu de novo [53].

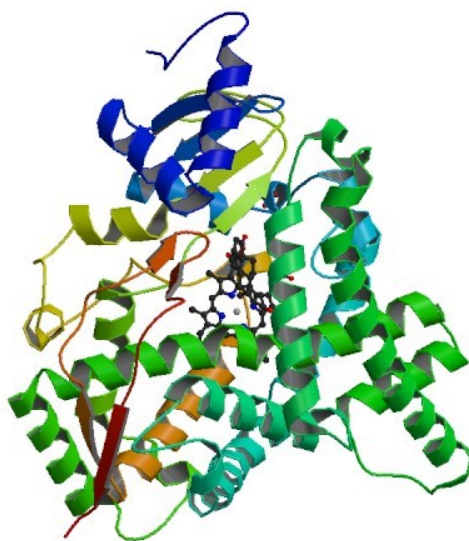
### 2.2.3 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) patří mezi nejdůležitější enzymy, které rozkládají xenobiotika (cizorodé látky) a tím se podílejí na ochraně buněk. Velmi důležitou roli mají v biotransformaci xenobiotik, kde se podílejí na oxidačních reakcích. Substráty pro CYP jsou v této fázi přeměňovány na polárnější produkty, díky čemuž mohou být z organismu následně vyloučeny. Kromě toho, že vlivem CYP dochází k této oxidační detoxikaci cizorodých látek, může v některých případech dojít k aktivaci xenobiotik. Aktivace xenobiotik může být pozitivní, pokud se jedná o léčiva, které se tak mění na jejich aktivní formy. Pokud se jedná o toxickou látku, po její aktivaci enzymem CYP může být produkt ještě toxičtější než původní látka a v krajních případech i kancerogenní [52].

Enzymy CYP jsou klíčovými enzymy i pro metabolismus endogenních (tělu vlastních) látek, například lipidů či žlučových kyselin. Některé cytochromy P450 se podílejí na steroidogenezi, tedy biosyntéze steroidních hormonů z cholesterolu (Obr. 12 [53], str. 23).

#### 2.2.3.1 CYP19 (aromatasa)

Aromatáza (CYP19) je steroidní enzym, který se podílí na přeměně androgenů (samčích pohlavních hormonů) na estrogeny (samičí pohlavní hormony). Narušení syntézy estrogenů je možné dosáhnout inhibicí posledního kroku v cestě biosyntézy estrogenů, což je reakce, která transformuje androgeny na estrogeny vytvořením aromatického kruhu ve steroidní molekule prostřednictvím enzymu CYP19. Funkce aromatázy může být narušena různými chemikáliemi, což může vést ke sníženým koncentracím estrogenů a následně k reprodukčním poruchám (Obr. 13 [54]) [55].



*Obrázok 13: Struktura lidského rekombinantního CYP19 (aromatázy). Na obrázku jsou vyznačeny struktury  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -skládané listy a otáčky. Uprostřed je tmavomodrou barvou vyznačený hem [54].*



#### 2.2.4 Steroidní hormony

Mezi steroidy řadíme i látky vyznačující se hormonální aktivitou. Steroidní hormony můžeme najít u savců, plazů, ryb či obojživelníků. Steroidy dělíme podle několika kritérií:

##### **Podle struktury [56]:**

- odvozené od pregnanu: hormony kůry nadledvin (kortikoidy) a progesteron
- odvozené od androstanu: mužské pohlavní hormony (testosteron a androsteron)
- odvozené od estranu: ženské pohlavní hormony (estrogeny)

##### **Podle účinku [56]:**

- pohlavní hormony
- hormony kůry nadledvinek

##### 2.2.4.1 Testosteron

Je nejdůležitějším hormonem ze skupiny androgenů, mužských pohlavních hormonů. Tvoří se v intersticiálních buňkách varlat a v menší míře v kůře nadledvinek. Jeho produkce je podmínkou normálního průběhu spermatogeneze. U muže odpovídá rovněž za vývoj sekundárních pohlavních znaků. Jeho hlavním metabolickým účinkem je aktivace anabolických procesů, zejména podpora syntézy kosterních bílkovin. V současnosti známe mnoho syntetických derivátů testosteronu s anabolickým účinkem, které bývají ve sportovním odvětví často zneužívány [56].

#### 2.2.4.2 Estradiol

Je nejdůležitějším z estrogenů, ženských pohlavních hormonů. Jeho produkce je podmínkou správné tvorby pohlavních znaků u žen, odpovídá za proliferaci endometria, uskladňování tuku v podkoží a zastavení růstu dlouhých kostí. Vzniká z testosteronu aromatizací kruhu A. Na sedmnáctém uhlíku je v poloze beta navázána hydroxylová skupina. Estradiol umí být biologicky aktivní jen v této formě. V případě, že se hydroxylová skupina vyskytuje v poloze alfa, jde o biologicky inaktivní estradiol. Estron s aromatickým kruhem A vzniká z estradiolu zejména u žen po menopauze [56].

## 2.3 Tenkovrstevná chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC, z angl. *Thin Layer Chromatography*) patří k adsorpční chromatografii, což je jedna z nejstarších a nejrozšířenějších metod analytické chemie. Hlavní využití má TLC při separaci nepochárných látek a je používána zejména při analýze zkoumané směsi. Velkou výhodou TLC je časová úspora, malá spotřeba látek a rozpouštědel a lehké provedení.

Princip TLC vychází z pevného adsorbentu (stacionární fáze) obtékaného vhodným rozpouštědlem (mobilní fáze), které analyzovanou směs látek unáší. Na povrchu adsorbentu (silikagel,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CaCO}_3$ , aktivní uhlí) dochází k různě silné adsorpci těchto látek na stacionární fázi, díky čemuž dochází k separaci látek. Na polárních sorbentech jsou důležité interakce ion - dipól, zatímco u nepochárných sorbentů jde převážně o van der Waalovy síly.

Kvůli mechanické stabilitě je pro TLC výhodnější použití litých vrstev oproti sypaným (např. oxid hlinitý, celulóza). Lité vrstvy jsou připraveny ze suspenze stacionární fáze (silikagel) a pojiva (sádra), často se používá například  $\text{Al}_2\text{O}_3$  na hliníkové fólii. Existuje několik možností, jak může být provedení TLC uspořádáno. Při separaci pomocí TLC využíváme nejčastěji tzv. šikmé uspořádání, během kterého je deska ve vyvíjecí nádobě (chromatografická komora) umístěna pod úhlem přibližně  $20^\circ$  a na dně je nalité

rozpouštědlo tak, aby dolní hrana desky byla smáčena mobilní fází. Deska může být v komůrce umístěna i vertikálně, tehdy se jedná o vzestupnou nebo sestupnou chromatografii v závislosti na umístění rozpouštědla. Papírová TLC je založena na principu rozdělovací chromatografie, na rozdíl od ostatních TLC, které jsou založeny na principu adsorpční chromatografie. Pro identifikaci separovaných látek je důležité provádět na stejné chromatografické desce též separaci standardů [57].

Pokud jsou skrvny barevných látek okem viditelné, mohou být látky detekovány přímo. Detekce může být také založena na absorpci světla v UV oblasti, fluorescenci či pomocí specifického zabarvení, které vzniká následkem působení charakteristického činidla (např. kyseliny sírové) [57].

### 3 Cíle práce

Cílem předkládané bakalářské práce bylo studovat účinky vybraných vůní (parfémy a průmyslové vůně do aut) na aktivitu aromatasy a na základě orientační TLC metody případně najít její potenciální inhibitory. K dosažení tohoto cíle bylo třeba splnit následující dílčí úkoly:

- Sestavení a optimalizace reakční směsi
- Studium metabolické přeměny substrátu aromatasy v přítomnosti jejího inhibitoru
- Testování vlivu vybraných vůní na aktivitu aromatasy

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Použité chemikálie

##### **Sigma-Aldrich (Německo)**

silikagelové TLC dosky, letrozol, NADPH

##### **Lach-Ner (Česká republika)**

dichlormethan, hexan, dihydrogenfosforečnan draselný

##### **Lachema (Česká republika)**

diethylether

##### **VWR Chemicals (Francie)**

methanol

##### **Koch Light Laboratories (Anglie)**

testosteron, estradiol

##### **Corning® Supersomes™**

ľudská CYP19 + P450 reduktáza

#### 4.1.2 Použité přístroje

##### **Centrifuga**

Schoeller Instruments, Hettich Zentrifugen™ EBA 270 s výkyvným rotorem 6 x 15 ml  
(Německo)

##### **Vortex**

IKA™ MS1 Minishaker (USA)

##### **Inkubátor**

Julabo TW12 (Německo)

##### **Vakuová pumpa**

Laboport, KNF Lab (USA)

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Sledování metabolické aktivity aromatasy metodou TLC

Inkubační směs o celkovém objemu 500  $\mu$ l obsahovala:

50  $\mu$ M testosteron (TST) v MeOH (5mM zásobní roztok methanolu)

1 mM NADPH (roztok v destilované vodě), 1 mM NADPH-generující systém, nebo jen destilovaná voda

rekombinantní CYP19 (15  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 60  $\mu$ M)

parfém (10x ředěný MeOH), průmyslová vůně (10x, 25x ředěná MeOH) nebo jen MeOH

inhibitor aromatasy, letrozol (250  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 2  $\mu$ M) ředěný v MeOH

nebo jen MeOH

K-fosfátový pufr (0,1 M, pH 7,4) tak, aby výsledný objem inkubační směsi

činil 500  $\mu$ l

Do skleněné zkumavky byl odměřený pufr, TST jako substrát a CYP19. Tato reakční směs byla rozdělena dalších skleněných zkumavek. Do těchto zkumavek byl přidán parfém, průmyslová vůně, letrozol nebo pouze MeOH. Zkumavky byly v inkubátoru vytemperovány na 37 °C a bylo do nich přidáno NADPH, NADPH-generující systém nebo destilovaná voda. Okamžitě po jejich přidavku byla zahájena inkubace (0, 10, 20 nebo 40 minut) při teplotě 37 °C za stálého třepání v inkubátoru.

Po uplynutí inkubační doby byla reakce ukončena přidavkem 2 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , směs ve zkumavkách byla promíchána po dobu 10 sekund na přístroji Vortex a následně byla odstředěna při rychlosti 3000 RPM po dobu 5 minut. Ze spodní organické fáze bylo odebráno automatickou pipetou 1,5 ml do čistých skleněných zkumavek. Směsi byly pomocí odparky odpařeny do sucha za vakua.

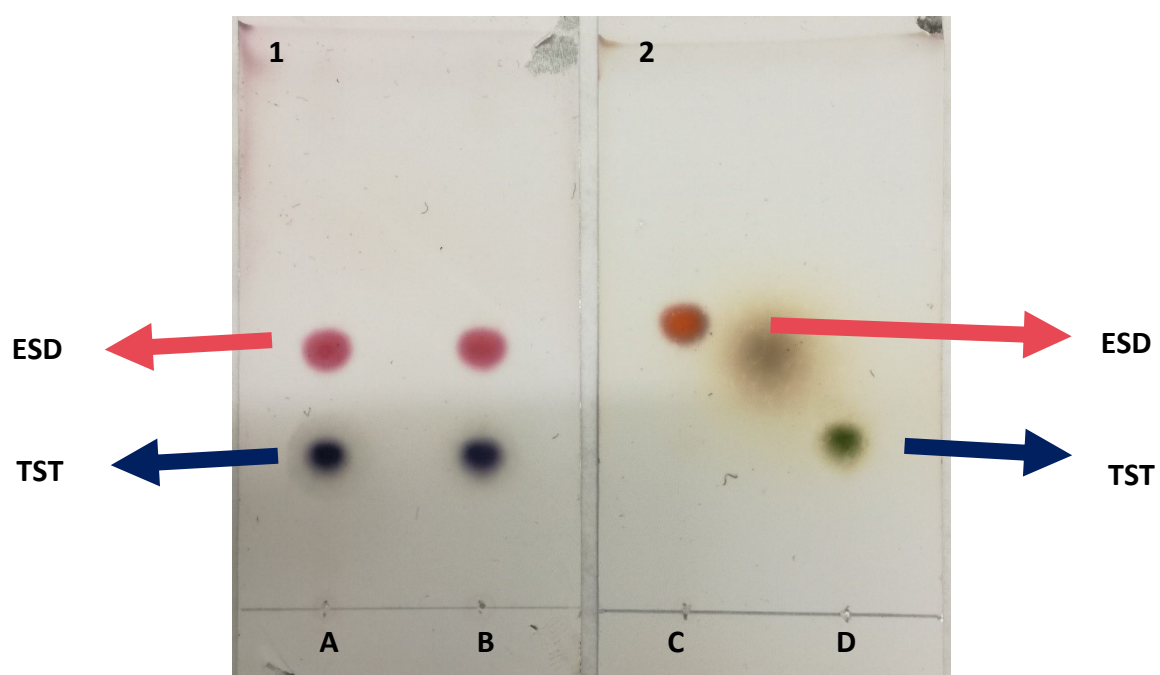
Následně byly odpařené vzorky rozpuštěny ve 200  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a bylo provedeno další odpaření. Následně byly rozpuštěny ve 20  $\mu\text{l}$  MeOH a nanoseny přibližně 1,5 cm od spodního okraje na silikagelovou desku pro TLC. Chromatografické vyvíjení probíhalo v chromatografické vaně s rozpouštědly hexan: diethylether v poměru 1: 4 (v/v). Poté byl k vizualizaci skvrn použitý 10%-ní (v/v) roztok kyseliny sírové, nanesený pomocí rozprašovače. Deska byla ponechána k usušení na vzduchu a následně byla zahřívána proudem horkého vzduchu za pomoci fénu. Nakonec byla deska ještě opatrně a krátce zahřívána na plotýnce.



## 5 Výsledky práce

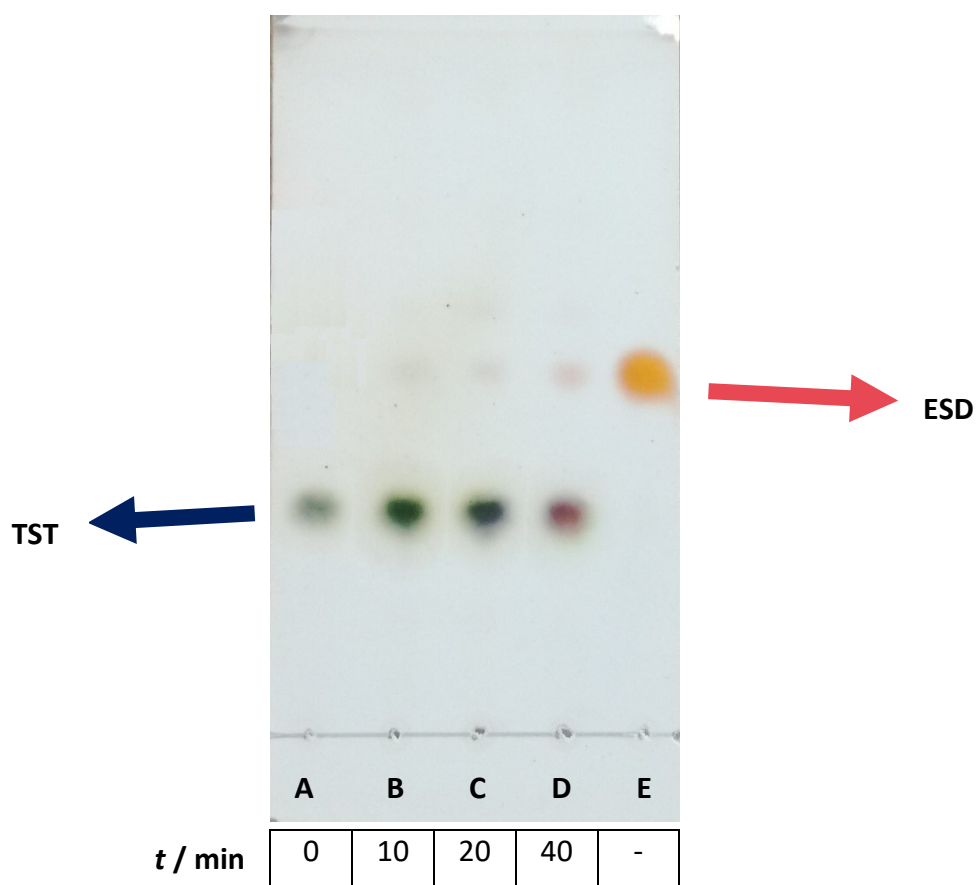
### 5.1 Optimalizace reakční směsi

TLC štandardu:



Obr. 14: TLC štandardu. A, B: směs pufru, TST a ESD; C: ESD, D: TST

### Optimalizace inkubační doby:



Obr. 15: TLC deska při optimalizaci doby inkubace. Reakční směs obsahovala pufr, TST a CYP19 a byla inkubována: A: 0 min, B: 10 min, C: 20 min, D: 40 min. Na dráhu E bylo nanesených 10 ml 50  $\mu\text{M}$  zásobního roztoku ESD. Koncentrace aromatasy v reakční směsi je 15  $\mu\text{M}$ .

### Porovnání NADPH a NADPH-generujícího systému:

500  $\mu$ l 10 mM NADPH-generujícího systému obsahovalo:

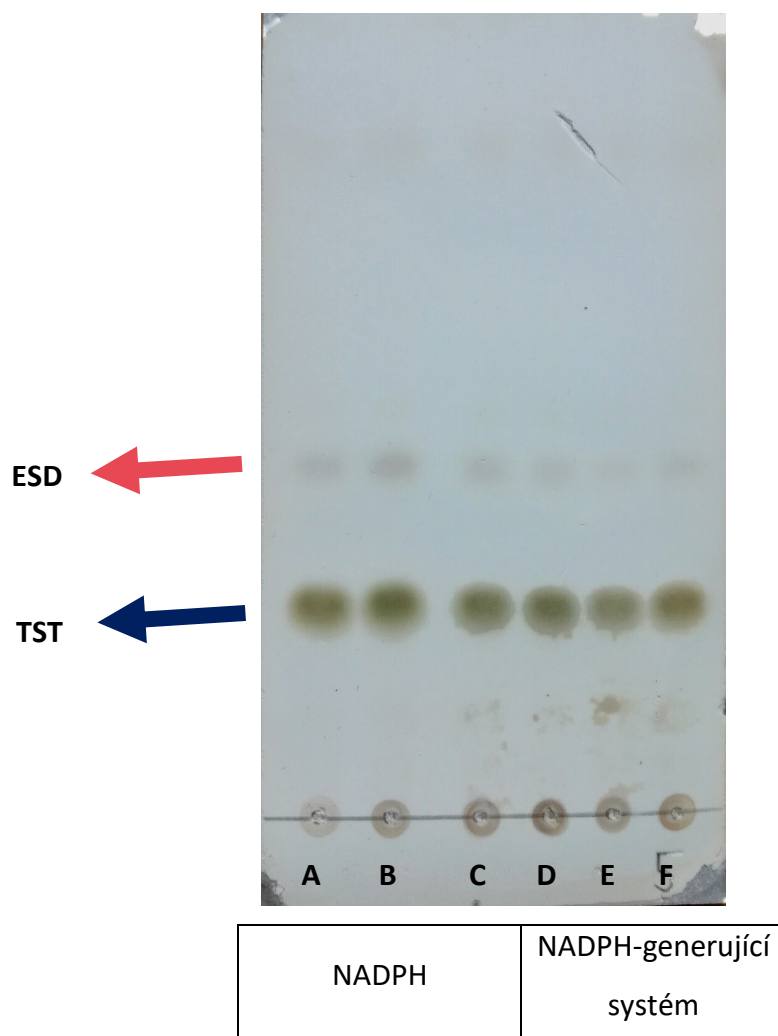
0,1 mM NADP<sup>+</sup>

1 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM glukóza-6-fosfát

0,1 U/ml glukóza-6-fosfát dehydrogenáza

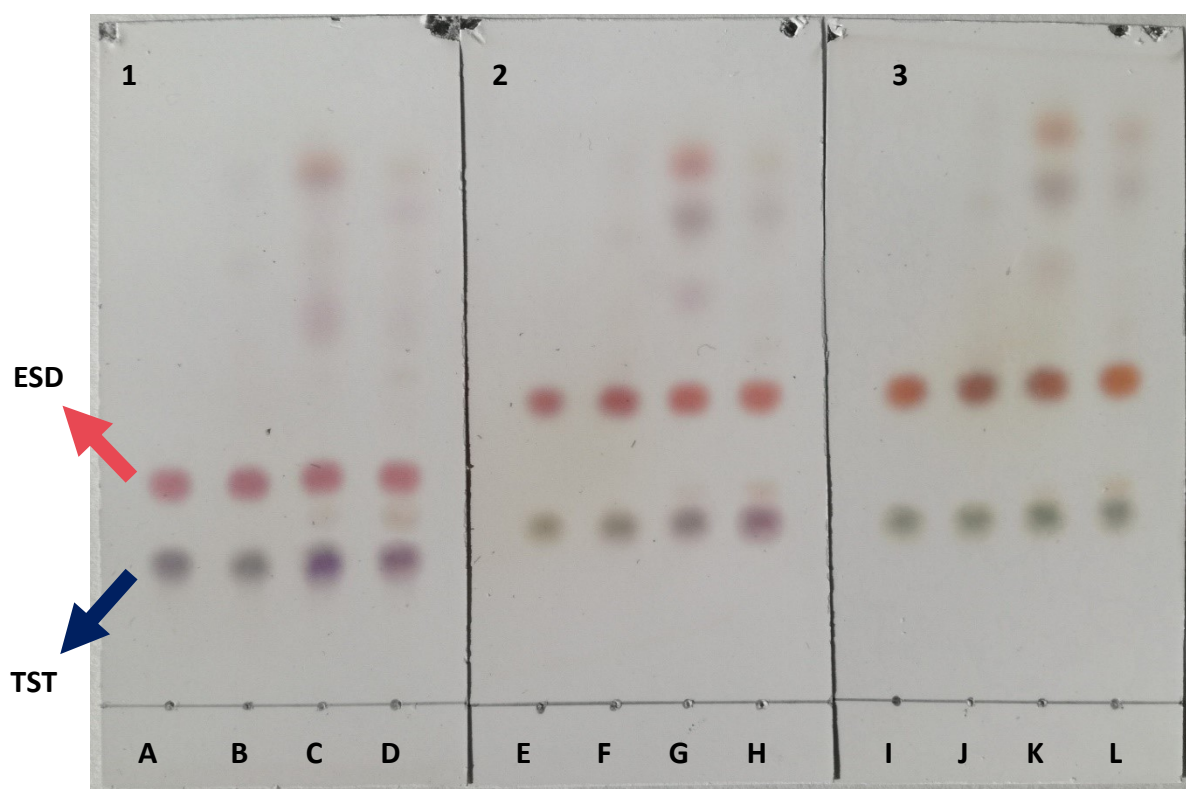
destilovaná voda tak, aby celkový objem činil 500  $\mu$ l



Obr. 16: TLC deska pro porovnání NADPH a NADPH-generujícího systému. Reakční směs obsahovala pufr, TST a CYP19. Dráhy A, B, C: NADPH a dráhy D, E, F: NADPH-generující systém. Koncentrace aromatasy v reakční směsi je 15  $\mu$ M.

### Optimalizace pH:

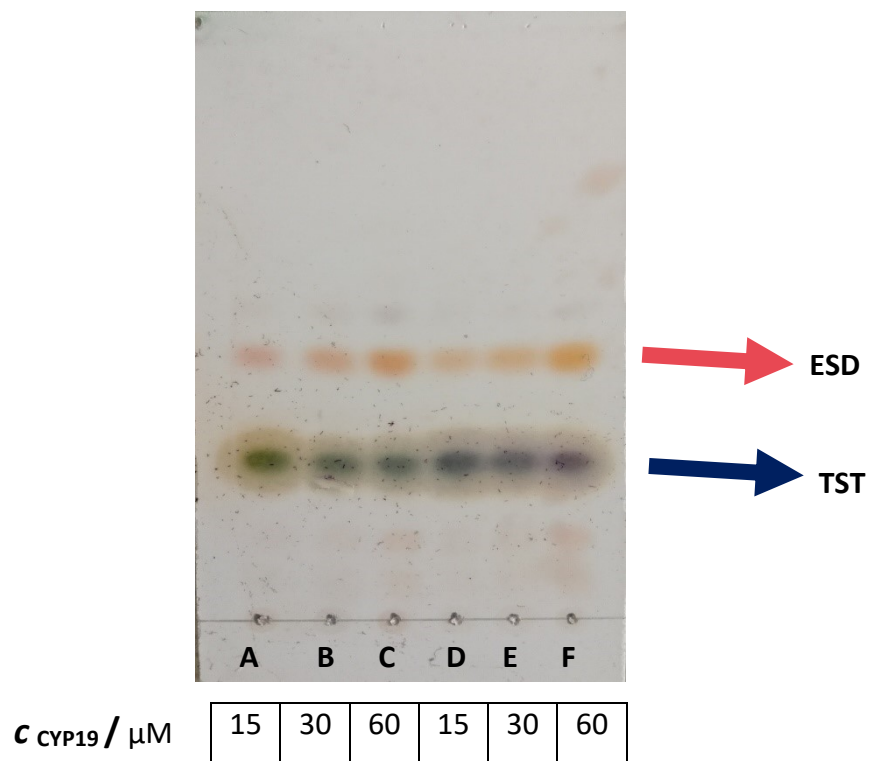
Chromatografické vyvíjení probíhalo v chromatografické vaně za různých pH. Pomocí stříkačky byly do uzavřené chromatografické vany napouštěné páry  $\text{NH}_3$  při vyvíjení první desky a páry  $\text{HCl}$  při vyvíjení druhé desky. Chromatografické vyvíjení třetí desky probíhalo za neutrálního pH.



pH	alkalické	kyselé	neutrální
----	-----------	--------	-----------

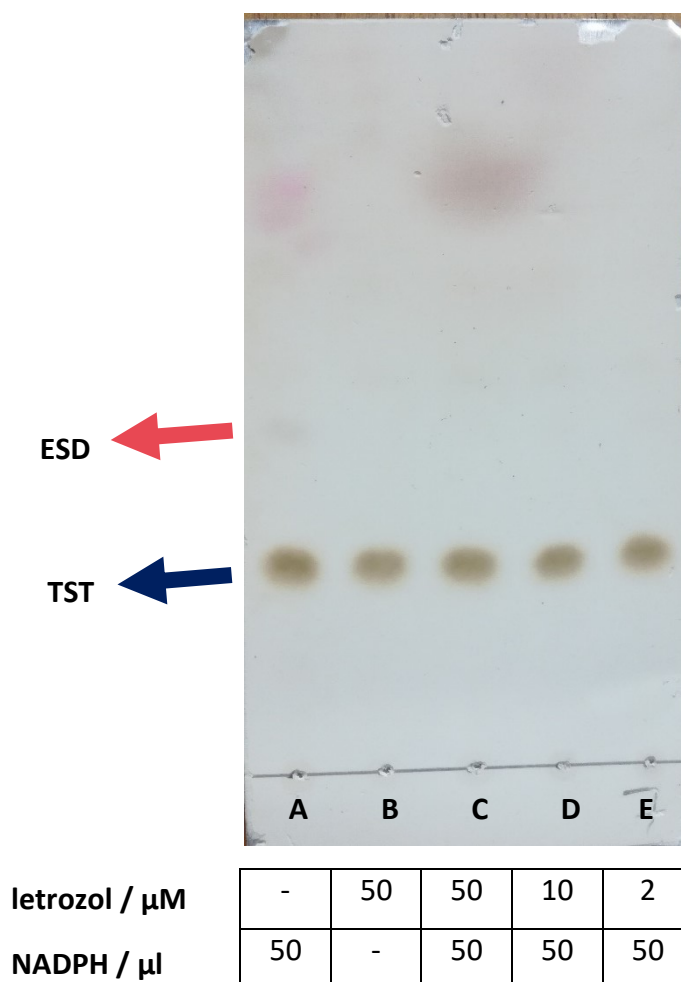
Obr. 17: TLC desky při optimalizaci pH. Deska číslo 1 je za alkalického pH ( $\text{NH}_3$ ), deska číslo 2 za kyselého pH ( $\text{HCl}$ ) a deska číslo 3 za neutrálního pH. Na drahách A, E, I je standard, tedy po 10 ml TST a ESD. Na drahách B, F, J je parfém Chanel<sup>TM</sup> N°5; na C, G, L je parfém Lancôme<sup>TM</sup> La Vie Est Belle a na drahách D, H, L parfém Bvlgari<sup>TM</sup> Goldea The Roman Night. Koncentrace aromatické směsi je 15  $\mu\text{M}$ .

### Optimalizace koncentrace aromatasy:



Obr. 18: TLC deska pro optimalizaci koncentrace aromatázy. Látkové množství rekombinantního CYP19 v 500  $\mu\text{l}$  reakční směsi: A, D: 15  $\mu\text{M}$ ; B, E: 30  $\mu\text{M}$ ; C, F: 60  $\mu\text{M}$ . A, B, C: aromatáza, která byla již jednou rozmražená. D, E, F: nová aromatáza.

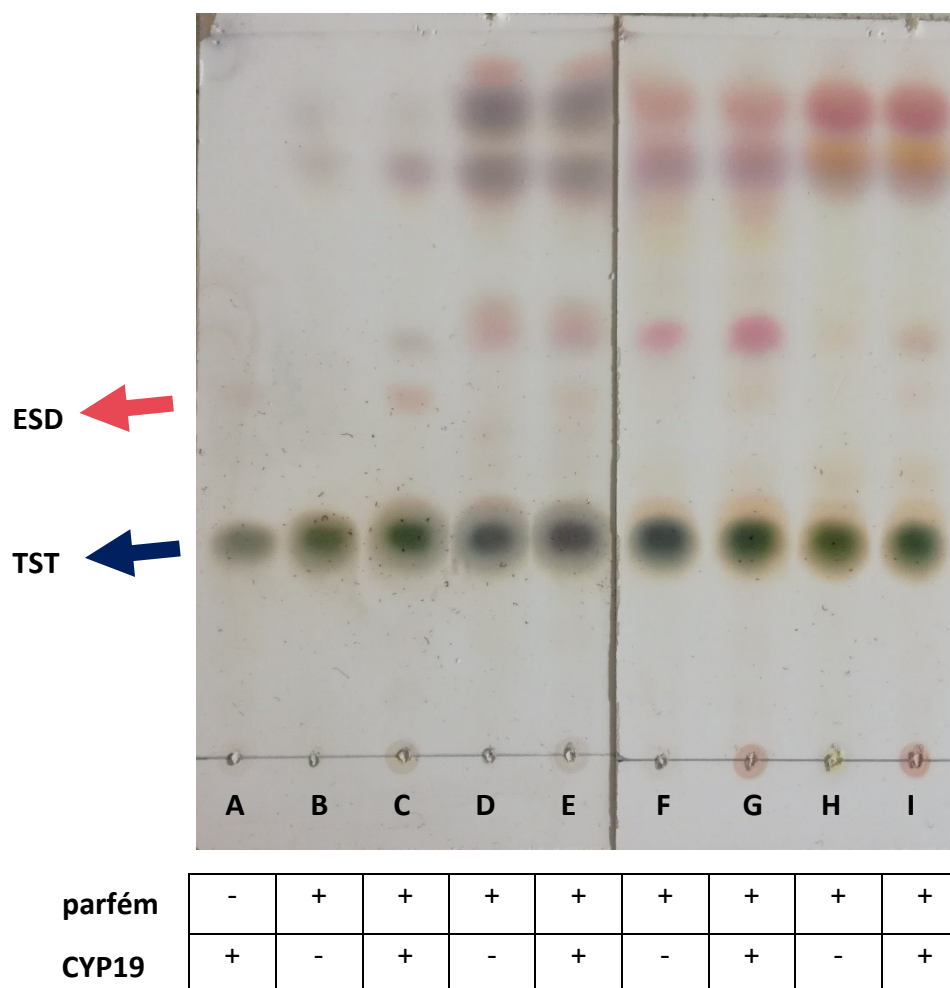
## 5.2 Inhibice aromatasy



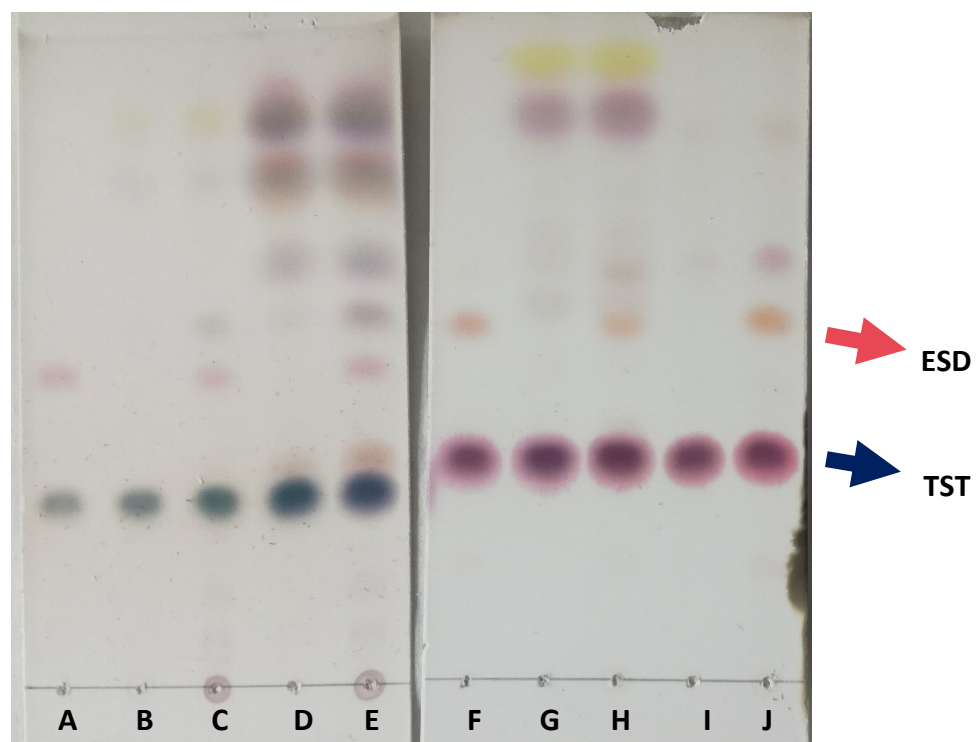
Obr. 19: TLC deska pro studium účinků inhibitoru aromatasy, letrozolu, na její aktivitu. Koncentrace aromatasy v reakční směsi je  $15 \mu\text{M}$ . A (standard): TST, CYP19, MeOH,  $50 \mu\text{l}$  NADPH; B: TST, CYP19,  $50 \mu\text{M}$  letrozol,  $50 \mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O (namísto NADPH); C: TST, CYP19,  $50 \mu\text{M}$  letrozol,  $50 \mu\text{l}$  NADPH; D: TST, CYP19,  $10 \mu\text{M}$  letrozol,  $50 \mu\text{l}$  NADPH; E: TST, CYP19,  $2 \mu\text{M}$  letrozol,  $50 \mu\text{l}$  NADPH.

## 5.3 Testování

### Testování parfémů:



Obr. 20: TLC deska pro studium účinků vybraných parfémů na aromatasu. Koncentrace aromatasu v reakční směsi je 15  $\mu$ M. Dráha A je standard bez parfému. Parfémy obsažené v jednotlivých drahách: B, C: Miss Dior™ Blooming Bouquet; D, E: Dior™ J'Adore; F, G: Bvlgari™ Goldea The Roman Night; H, I: Chloé™ Love Story.

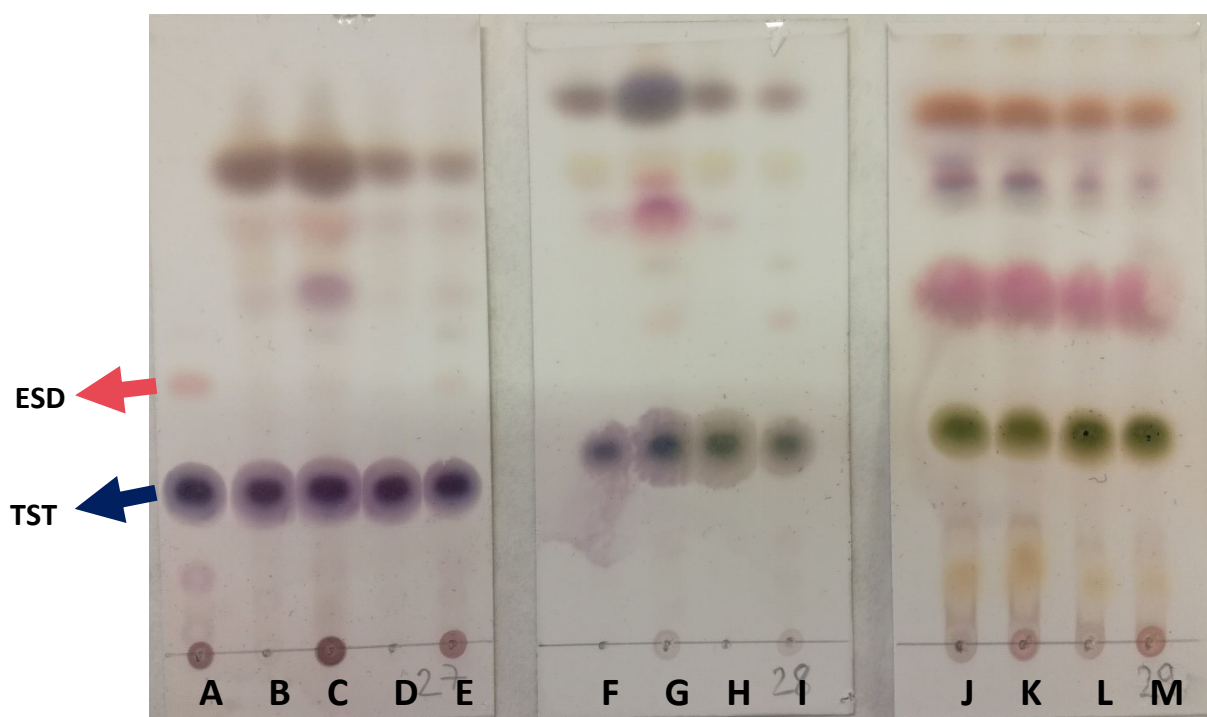


parfém	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CYP19	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+

Obr. 21: TLC deska pro studium účinku vybraných parfémů na aromatasu. Koncentrace aromatasu v reakční směsi je 15  $\mu\text{M}$ . Dráhy A a F jsou standardy bez parfému. Parfémy obsažené v jednotlivých drahách: B, C: Hugo Boss™ Bottled; D, E: Lancôme™ La Vie Est Belle; G, H: Versace™ Bright Crystal; I, J: Chanel™ N°5.



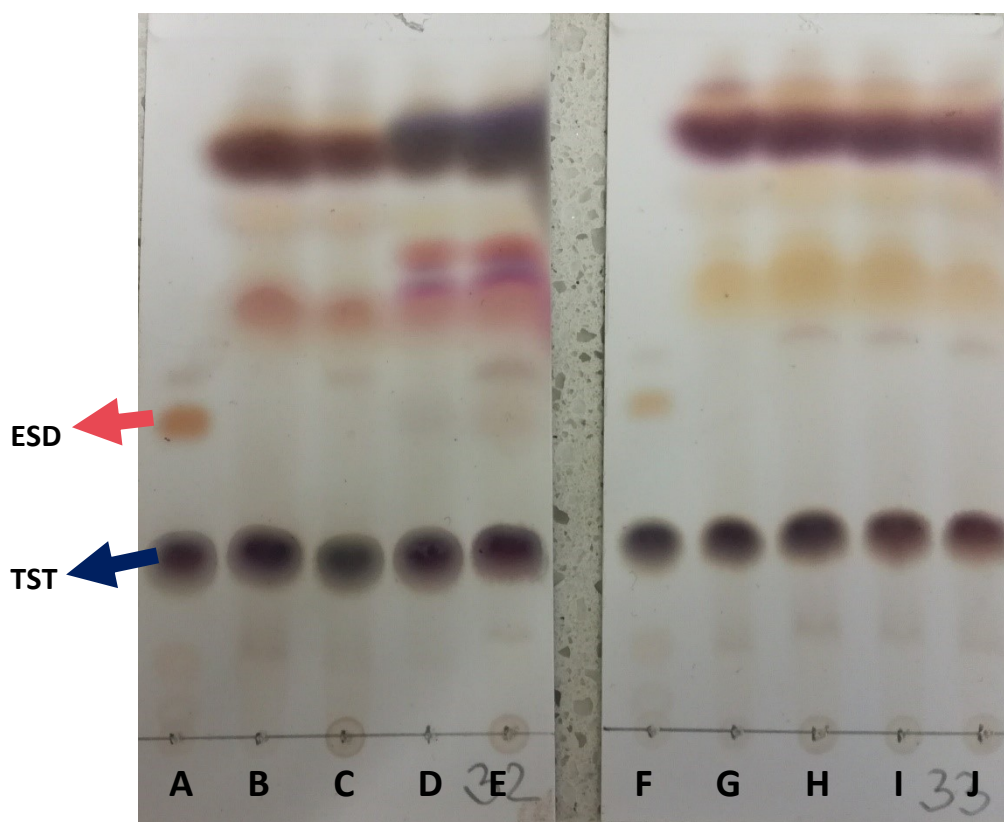
## Testování průmyslových vůní:



vůně	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ředění	-	10x	10x	25x	25x	10x	10x	25x	25x	10x	10x	25x	25x
CYP19	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

Obr. 22: TLC desky pro studium účinku průmyslových vůní do aut na aktivitu aromatasy. Koncentrace aromatasy v reakční směsi je 60  $\mu$ M. A je standard bez přidané vůně. Průmyslové vůně obsažené v inkubačních směsích: B, C, D, E: Parfém 1; F, G, H, I: Parfém 2; J, K, L, M: Parfém 3.

Testování průmyslových vůní spolu s letrozolem:



<b>vůně</b>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<b>letrozol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<b>CYP19</b>	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+

Obrázok 23: TLC desky pro studium účinku průmyslových vůní do aut na aktivitu aromatasy. Koncentrace aromatasy v reakční směsi je 60  $\mu$ M. A, F jsou standardy bez přidané vůně. Průmyslové vůně obsažené v inkubačních směsích: B, C, G, H, I, J: Parfém 1; D, E: Parfém 2. Dráha I obsahuje 50  $\mu$ M letrozol a dráha J 250  $\mu$ M letrozol.

## 6 Diskuze

Předkládaná bakalářská práce je zaměřena na studium aromatasu, CYP19, s cílem sledování modulace její aktivity parfémy a průmyslovými vůněmi.

Parfémy mohou být potenciálními hormonálně aktivními látkami i přes testování chemických látek, které zabezpečuje ECVAM. Je tedy možná modulace funkce endokrinního systému, následkem čehož mohou vznikat zdravotní problémy a reprodukční poruchy. Problémem testování alternativními metodami při *in vitro* testech je krátká doba expozice, při níž je možné odhalit pouze akutní a nikoli subakutní toxicitu. Chemické sloučeniny, které jsou komponentami parfémů a kosmetiky, se zkoumají samostatně, ale nejsou testovány možné interakce mezi více přítomnými složkami, které jsou obsaženy v těchto přípravcích. Metodou TLC je možné přímo zkoumat, jak ovlivňují parfémy a průmyslové vůně jako celek důležitý lidský enzym, aromatasu.

Bylo zjištěno, že TST se pohybuje na mobilní fázi pomaleji než ESD, a také z důvodu různého zbarvení po vyvolání chromatogramu jsou dobře rozlišitelné a identifikovatelné na TLC desce (Obr. 14, str. 33). Za optimální inkubační dobu byl zvolen čas 40 minut, protože při tomto čase bylo nejlépe vidět produkt, ESD, ve srovnání s kratšími časy 10 a 20 minut (Obr. 15., str. 34). Při srovnání NADPH a NADPH-generujícího systému jako iniciátoru reakce nebyly zjištěny významné rozdíly, proto byl nadále v experimentech používán NADPH (Obr. 16, str. 35). Při kyselé změně pH během vyvíjení chromatogramu zabezpečené kyselinou chlorovodíkovou nedošlo k ovlivnění jeho vyvíjení, nenastal žádný posun v zónách a dá se říci, že chromatogram vypadal srovnatelně jako při neutrálním pH. Naopak zásadité pH jako důsledek přítomnosti amoniaku vyvíjení chromatogramu ovlivnilo, a to tak, že látky mezi TST a ESD byly lépe rozlišitelné. Látky, které se objevovaly nad ESD byly však při zásaditém pH hůře rozlišitelné a z toho důvodu se v experimentech dále pokračovalo při neutrálním pH (Obr. 17, str. 36). Jako optimální koncentrace aromatasu byla zvolena 60  $\mu\text{M}$ , protože při ní byl produkt, ESD, nejvýraznější, což bylo výhodné při následujících testech s parfémy (Obr. 18, str. 37).

Při experimentech s inhibitorem aromatasy, letrozolem, se ukázalo, jak vypadá produkt reakce (ESD), která je katalyzována aromatasou na TLC desce v případě, kdy je její aktivita inhibována. Se zvyšující se koncentrací letrozolu je skrvna odpovídající ESD stále méně zřetelná. Na obrázku je tento jev hůře zaznamenanatelný, protože fotka byla vytvořena až po nějakém čase od provedení experimentu, takže všechny fleky za tu dobu mírně vybledly (Obr. 19, str. 38).

Při testování na kvalitních parfémeh z obchodů nebyla zjištěna žádná inhibice aromatasy, takže tyto testované výrobky se nezdají být hormonálně aktivními látkami. Bylo zkoumáno osm parfémů a to konkrétně: Miss Dior™ Blooming Bouquet, Dior™ J'Adore, Bulgari™ Goldene The Roman Night, Chloé™ Love Story, Hugo Boss™ Bottled, Lancôme™ La Vie Est Belle, Versace™ Bright Crystal a Chanel™ N ° 5. V drahách, kde byla přidávána aromátáza, je vidět flek ESD srovnatelně výrazný jako v dráze standardu, ve které žádný parfém přidáván nebyl (Obr. 20, str. 39 a Obr. 21, str. 40).

Při experimentech, ve kterých se testovaly průmyslový vůně na vliv aromatasy, bylo zjištěno, že tyto vůně by mohly aromatasu skutečně inhibovat a způsobovat tedy endokrinní dysfunkci. Ukázalo se, že vůně označené jako Parfém 1 a Parfém 2 od firmy JEES s.r.o. inhibují aromatasu, protože po jejich přidavku do reakční směsi zmizel produkt ESD. Je možné, že aromatasu reaguje s nějakou z komponent parfému a vzniká tak nová látka, resp. taková, která již je ve vůni přítomna, ale ve větší míře, protože některé skvrny odpovídající určité složce vůně na chromatogramu byly jasnější (Obr. 22, str. 41). Z tohoto experimentu ještě nebylo jasné, zda dané vůně inhibují aromatasu nebo reduktázu, která se v používané aromatasě vyskytuje jako nosič elektronů. Proto byly provedeny testy spolu s vůněmi a letrozolem, na základě kterých se ukázalo, že parfémy skutečně interagovaly s aromatasou (Obr. 23, str. 42).

## 7 Závěr

Jako optimální inkubační doba reakční směsi byla zvolena doba 40 minut. NADPH a NADPH-generující systém byly stejně efektivní v provedení tohoto experimentu. Za optimální pH byla zvolená neutrální oblast. Bylo zjištěno, že nejlepší koncentrace aromatasy ze zkoumaných byla koncentrace 60  $\mu\text{M}$ .

Ukázalo se, že inhibici aromatasy její známým inhibitorem letrozolem je jasně vidět na TLC desce.

Při provádění experimentu na parfémeh se ukázalo, že zkoumané parfémy nemají negativní vliv na aktivitu aromatasy. Naopak při testování průmyslových vůní byl potvrzen jejich účinek na aktivitu aromatasy a na základě používané orientační TLC metody můžeme předpokládat, že jsou inhibitory aromatasy a tedy patří do skupiny hormonální aktivních látek, které způsobují endokrinní dysfunkci.

## 8 Literatura

[1] Borowska, S., Malgorzata M. B. Metals in cosmetics: implications for human health. *Journal of Applied Toxicology* [online]. 2015, **35**(6), 551-572 [cit. 2019-05-26].

[2] Ullah H., Noreen S., Fozia, Rehman A., Waseem A., Zubair S., Adnan M., Ahmad I. 2013. Comparative study of heavy metals content in cosmetic products of different countries marketed in Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Arab. J. Chem.*

[3] Přejato z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/6e/Paraben-2D-skeletal.png/180px-Paraben-2D-skeletal.png>

[4] Flasiński M., Kowal S., Broniatowski M., Wydro P. Influence of Parabens on Bacteria and Fungi Cellular Membranes: Studies in Model Two-Dimensional Lipid Systems. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2018, **122**(8), 2332-2340 [cit. 2019-05-25].

[5] Final Report on the Safety Assessment of Aluminum Silicate, Calcium Silicate, Magnesium Aluminum Silicate, Magnesium Silicate, Magnesium Trisilicate, Sodium Magnesium Silicate, Zirconium Silicate, Attapulgite, Bentonite, Fuller's Earth, Hectorite, Kaolin, Lithium Magnesium Silicate, Lithium Magnesium Sodium Silicate, Montmorillonite, Pyrophyllite, and Zeolite. *International Journal of Toxicology* [online]. 2016, **22**, 37-102 [cit. 2019-05-26].

[6] Přejato z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/79/Phthalates.svg/220px-Phthalates.svg.png>

[7] Australian Academy of Science, [online]. Canberra, Australia. [cit 2019-05-25]. Dostupné z: <https://www.science.org.au/curious/people-medicine/chemistry-cosmetics>

[8] PEHLE, Tobias a Sylvia JONAS. *Parfém*. Čestlice: Rebo, 2009. ISBN 978-80-255-0050-7.

[9] Přejato z: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure/7/129/mfcd00006942.eps/jcr\\_content/renditions/mfcd00006942-medium.png](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure/7/129/mfcd00006942.eps/jcr_content/renditions/mfcd00006942-medium.png)

[10] Přejato z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/69/Alpha-pinen.svg/200px-Alpha-pinen.svg.png>

[11] Přejato z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/11/Delta-octalactone.svg/1200px-Delta-octalactone.svg.png>

[12] Přejato z: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/dd/Phenylpropanoic\\_acid.svg/1200px-Phenylpropanoic\\_acid.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/dd/Phenylpropanoic_acid.svg/1200px-Phenylpropanoic_acid.svg.png)

[13] Schreiner L., Bauber P., Buettner A. Resolving the smell of wood - identification of odour-active compounds in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1) [cit. 2019-05-24]. DOI: 10.1038/s41598-018-26626-8. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-26626-8>

[14] McGill Office for Science and Society. 2009 [online]. Montreal, Canada. [cit. 2019-05-26]. Dostupné z: <https://www.mcgill.ca/oss/article/history/story-perfume>

- 
- [15] Převzato a upraveno dle:  
[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/56/Cologne Strength vs. Cost vs. Cologne Concentration.jpg/220px-Cologne Strength vs. Cost vs. Cologne Concentration.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/56/Cologne_Strength_vs._Cost_vs._Cologne_Concentration.jpg/220px-Cologne_Strength_vs._Cost_vs._Cologne_Concentration.jpg)
- [16] Převzato z: <https://terpenesandtesting.com/wp-content/uploads/2017/01/Linalool.png>
- [17] Převzato z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/fd/Geraniol.svg/1000px-Geraniol.svg.png>
- [18] Sturm W., Mansfeld G. Tenacity and fixing of aromatic chemicals. *Perf. Flav.* 1976;1:6–16.
- [19] Kumar P, Caradonna-Graham VM, Gupta S, Cai X, Rao PN, Thompson J (November 1995). Inhalation challenge effects of perfume scent strips in patients with asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **75** (5): 429–33
- [20] Berenbaum, May (14 June 2010). "[Furanocoumarins as potent chemical defenses](#)"
- [21] De Groot AC & Frosch PJ. Adverse reactions to fragrances. *Contact Dermatitis* 1997; **36**: 57-86.
- [22] Wöhrl, S. , Hemmer, W. , Focke, M. , Götz, M. and Jarisch, R. (2001), The significance of fragrance mix, balsam of Peru, colophony and propolis as screening tools in the detection of fragrance allergy. *British Journal of Dermatology*, 145: 268-273.
- [23] "[Scientific Committee on Consumer Safety \(SCCS\) - Public Health - European Commission](#)"
- [24] European Commision [2004-05-25]. Opinion of the scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers. Dostupné z: [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/sccp/documents/out280\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sccp/documents/out280_en.pdf)
- [25] EUR-Lex. [2009-11-30]. REGULATION (EC) No 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2009R1223:20130711:en:PDF>
- [26] Environmental and Health Assessment of Substances in Household Detergents and Cosmetic Detergent Products
- [27] "[INSECT REPELLENTS – QUEST INTERNATIONAL B.V.](#)"
- [28] U.S. Food & Drug Administration, 2018-02-27 [online]. Washington, D.C., United States of America. [cit. 2019-05-19]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetics-science-research/product-testing-cosmetics>
- [29] U.S. Food & Drug Administration, 2017-11-22 [online]. Washington, D.C., United States of America. [cit. 2019-05-19]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/cosmetics/product-testing-cosmetics/animal-testing-cosmetics>
- [30] Dostupné z: [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine\\_disruptors/docs/cosmetic\\_1223\\_2009\\_regulation\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine_disruptors/docs/cosmetic_1223_2009_regulation_en.pdf)
- [31] OECD [2014-12-15]. *Test No. 2011: GUIDANCE DOCUMENT FOR DESCRIBING NON-GUIDELINE IN VITRO TEST METHODS*. Dostupné z: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2014\)35&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2014)35&doclanguage=en)

- 
- [32] AltTox, 2019 [online]. [cit. 2019-05-26] Dostupné z: <http://alttox.org/>
- [33] MANNERSTRÖM, Marika, Tarja TOIMELA, Jertta-Riina SARKANEN a Tuula HEINONEN. Human BJ Fibroblasts is an Alternative to Mouse BALB/c 3T3 Cells in In Vitro Neutral Red Uptake Assay. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* [online]. 2017, **121**, 109-115 [cit. 2019-05-26]. DOI: 10.1111/bcpt.12790. ISSN 17427835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/bcpt.12790>
- [34] OECD (2018), *Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070707-en>.
- [35] OECD (1981), *Test No. 411: Subchronic Dermal Toxicity: 90-day Study*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070769-en>
- [36] SASAKI, Kiyoshi, Makoto UMEDA, Ayako SAKAI, Shojiro YAMAZAKI a Noriho TANAKA. Transformation Assay in Bhas 42 Cells: A Model Using Initiated Cells to Study Mechanisms of Carcinogenesis and Predict Carcinogenic Potential of Chemicals. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* [online]. 2015, **33**(1), 1-35 [cit. 2019-05-26]. DOI: 10.1080/10590501.2014.967058. ISSN 1059-0501. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10590501.2014.967058>
- [37] OECD (2004), *Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071162-en>.
- [38] NETZLAFF, Frank, C.-M. LEHR, P.W. WERTZ a U.F. SCHAEFER. The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2005, **60**(2), 167-178 [cit. 2019-05-26]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2005.03.004. ISSN 09396411. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641105001116>
- [39] Fentern, J. H., „Validation of in vitro Tests for Skin Corrosivity“, *ALTEX*, č. 16, **1999**.
- [40] ABUD, Ana Paula Ressett, Crisciele KULIGOVSKI, Natássia Caroline Resende CORRÊA, et al. The inhibition of adipogenesis via an in vitro assay can reduce animal use by more precisely estimating the starting dose for the acute toxic class method. *Toxicology Letters* [online]. 2019, **311**, 80-90 [cit. 2019-05-20]. DOI: 10.1016/j.toxlet.2019.04.009. ISSN 03784274. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037842741831823X>
- [41] DI SOTTO, Antonella, Gabriela MAZZANTI, Fabio CARBONE, Patrizia HRELIA a Francesca MAFFEI. Genotoxicity of lavender oil, linalyl acetate, and linalool on human lymphocytes in vitro. *Environmental and Molecular Mutagenesis* [online]. 2011, **52**(1), 69-71 [cit. 2019-05-20]. DOI: 10.1002/em.20587. ISSN 08936692. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/em.20587>
- [41] Wallack, Grace. "RETHINKING FDA'S REGULATION OF COSMETICS." *HARVARD JOURNAL ON LEGISLATION* 56.1 (2019): 311-339.
- [42] EUR-Lex. [2009-11-30]. NARIADENIE EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1223/2009. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/TXT/PDF/?uri=CELEX:02009R1223-20160812&from=EN>
- [43] Scientific Committee on Consumer Safety. [2019-05-10] Allergy Alert Test (AAT) as a proof-of-concept study. [https://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/consumer\\_safety/opinions\\_en](https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/opinions_en)
- [44] Cosmetic Ingredient Review. 2016 [online]. [cit. 2019-05-24] Dostupné z: <https://www.cir-safety.org/>



---

[45] U.S. Food & Drug Administration, 2017-03-11 [online]. Prohibited & Restricted Ingredients in Cosmetics. Washington, D.C., United States of America. [cit. 2019-05-19]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetics-laws-regulations/prohibited-restricted-ingredients-cosmetics#prohibited>

[46] [http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/pdf/COSING\\_Annex%20II\\_v2.pdf](http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/pdf/COSING_Annex%20II_v2.pdf)

[47] Převzato z:

[https://www.accustandard.com/media/catalog/product/cache/1/structure\\_img/400x400/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/m/o/molecular\\_structure\\_PROD0010027.png](https://www.accustandard.com/media/catalog/product/cache/1/structure_img/400x400/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/m/o/molecular_structure_PROD0010027.png)

[48] VAN MEEUWEN, J.A., O. VAN SON, A.H. PIERSMA, P.C. DE JONG a M. VAN DEN BERG. Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2008, **230**(3), 372-382 [cit. 2019-05-26]. DOI: 10.1016/j.taap.2008.03.002. ISSN 0041008X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X08001208>

[49] Převzato z: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/65/Benzyl\\_butyl\\_phthalate.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/65/Benzyl_butyl_phthalate.png)

[50] Fail, P. A., C. S. Sloan, et al. (2002). Steroidogenesis screening assays and endocrine disruptors, BATTELLE.

[51] TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5.

[52] Sanderson, J. T. (2006). "The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals." *Toxicological Sciences* 94(1): 3-21. <https://academic.oup.com/toxsci/article/94/1/3/1711609>

[53] Sanderson, T. and M. van den Berg (2003). "Interactions of xenobiotics with the steroid hormone biosynthesis pathway." *Pure and Applied Chemistry* 75(11-12): 1957-1971. <https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/pac.2003.75.issue-11-12/pac200375111957/pac200375111957.pdf>

[54] Převzato z: <http://www.rcsb.org/structure/4KQ8>

[55] FURR, B. J. A. *Aromatase inhibitors*. Boston: Birkhäuser, c2006. ISBN 3764374187.

[56] MATOUŠ, Bohuslav, et al. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vydání. Praha : Galén, 2010. 540 s. ISBN 978-80-7262-702-8.

[57] GALUSZKA, Petr a Lenka LUHOVÁ. *Laboratorní technika pro biochemiky*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2003. ISBN 80-244-0640-3.